

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



Russian Committee  
for Patents and Trademarks

(19) RU (11) 2071351 (13) C1  
(51) 6 A 61 K 38/17

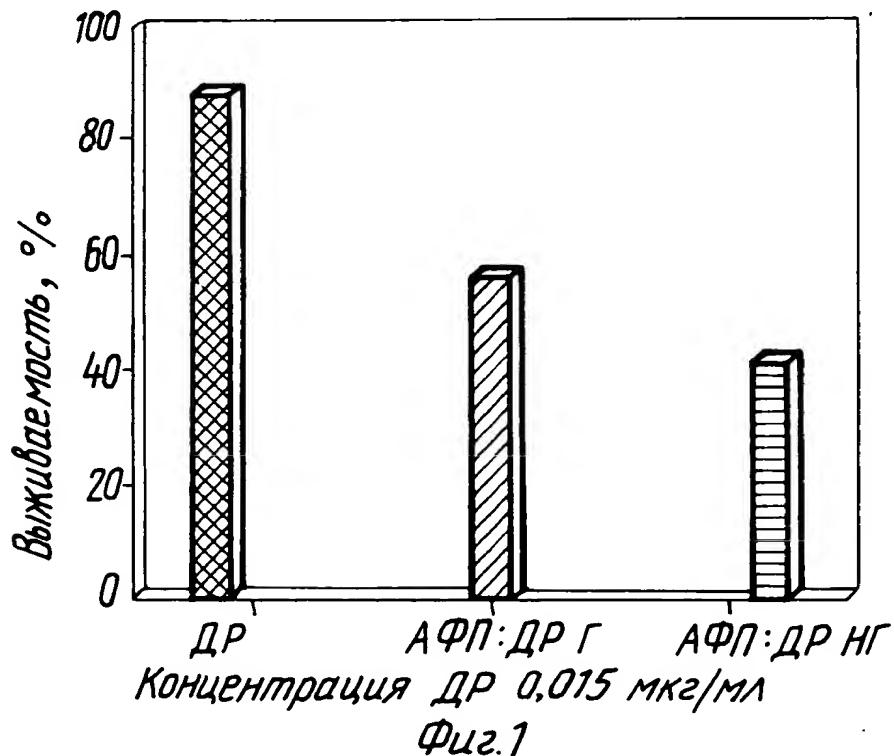
(12) ABSTRACT OF RUSSIAN PATENT

1

(21) 96113877/14 (22) 23.07.96  
(46) 10.01.97  
(71) Moskovskij nauchno-issledovatel'skij institut meditsinskoj ehkologii (RU), Zakrytoe aktsionernoje obshchestvo "firma Intromed" (RU)  
(72) Luzhkov Jurij Mikhajlovich[RU], Moskaleva Eli-zaveta Jur'evna[RU], Nakash'jan Rajmond[ES], Posypanova Galina Aronovna[RU], Rodina Alla Valer'evna[RU], Severin Evgenij Sergeevich[RU], Severin Sergej Evgen'evich[RU], Fel'dman Natalija Borisovna[RU], Finakova Galina Vasil'evna[RU], Shmyrev Igor' Igorevich[RU]  
(73) Moskovskij nauchno-issledovatel'skij institut meditsinskoj ehkologii (RU), Zakrytoe aktsionernoje

2

obshchestvo "firma Intromed" (RU)  
(54) CONJUGATE OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES WITH \$\$\$-FETOPROTEIN SHOWING THE SELECTIVE ACTION WITH RESPECT TO CANCER TUMORS; METHOD OF THEIR PREPARING (VARIANTS) AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION BASED ON THEREOF  
(57) FIELD: medicine, oncology. SUBSTANCE: product: conjugates with \$\$\$-fetoprotein showing the selective action with respect to cancer target-cells where the conjugated particles were bound by chemical bond and exhibiting resistance against proteases and other enzymes of biological fluids. Method of conjugate preparing involves interaction of protein or biologically



RU 2071351 C1

active substance containing amino-group with succinylimidyl-trans-4-(N-maleimidylmethyl)-cyclohexane-1-carboxylate followed by cross-linking of the prepared derivative with biologically active substance or protein part of \$\$\$-fetoprotein, respectively, by SH-groups. The latter can be incorporated additionally using 3-(2-pyridylthio)-propionic acid succinimide ether. Variant: condensation of amino-groups of protein with aldehyde group of

biologically active substance (parent or incorporated additionally after activation with periodate) followed by reduction of semiproduct with boron hydride. Pharmaceutical composition has effective amount of conjugate and carrier that can be useful for intravenous administration. Calichemycin is preferable active substance in conjugate. EFFECT: improved method of preparing, enhanced effectiveness of treatment  
b1b2b3b1

RU 2071351 C1

Изобретение относится к фармакологии, к изысканию принципиально новых противораковых лекарственных средств направленного действия.

Транспорт активных молекул к особым биологическим центрам был предложен еще в трудах Эрлиха более 100 лет назад. Такой принцип должен приводить к наибольшей эффективности и наименьшим побочным действиям лекарственных средств. Этот принцип особенно важен для онкологии, где в качестве лекарственной основы используются токсические вещества.

Осуществление этого принципа для онкологии стало возможным путем создания искусственных макромолекул, состоящих из векторной, специфической к раковым клеткам части, и неспецифической части, содержащей цитотоксическое средство. В этом случае поглощение лекарства клетками происходит не диффузионным, статистическим образом, как в случае низкомолекулярных веществ, а путем эндоцитоза и только теми клетками, которые имеют средство к векторной части. Даже если векторная макромолекула распадается на составные части не внутри, а на поверхности клеток-мишеней и лекарство попадает в клетку не в результате эндоцитоза, а обычным образом, то оно будет проявлять в результате осуществленной доставки к клеткам-мишеням избирательную токсичность в отношении этих клеток.

Прежде всего эти принципиально новые лекарственные средства направленного действия были созданы на основе моноклональных и поликлональных антител (векторная часть). В результате были получены различные иммуноконъюгаты с противоопухолевыми антибиотиками, растительными и бактериальными токсинами и др. противоопухолевыми веществами.

Такая простая схема создания новых противораковых средств на практике столкнулась со множеством реальных трудностей. Укажем на некоторые из них.

Проблемы, связанные с поверхностным раковым антигеном: специфичность ракового антигена. Он должен присутствовать на раковых клетках и отсутствовать на нормальных клетках. Ситуация усложняется тем, что многие антигенные маркеры, находящиеся на поверхности клеток, секретируются во внеклеточную среду, приводя к конкуренции между антигеном на поверхности и секрецируемым АГ, способность специфического ракового АГ подвергаться эндоцитозу.

Проблемы, связанные с конструкцией векторной макромолекулы.

Конъюгация двух частей макромолекулы с помощью ковалентной связи зачастую приводила: к уменьшению эффективности неспецифической части; к ухудшению свойств векторной части уменьшению сродства АГ к АТ, уменьшению способности к эндоцитозу; получению мало- или нерастворимых в традиционных растворителях продуктов.

При этом могут одновременно ухудшаться и

любые сочетания указанных свойств.

Эти проблемы привели к созданию целого ряда изобретений, посвященных исключительно принципам конструирования векторных макромолекул, причем особое место в них уделялось, принципам связи двух частей. Предпочтение при этом отдавалось лабильным связям типа гидролизуемых ковалентных химических связей, образующихся в т. ч. с помощью специальных "спейсеров" (пат. США N 4485093, кл. A 61 K 39/00, 1984), разрушаемым связям под действием облучения светом (ЕВР. пат. N 129434) и нековалентным типам связей, типа АГ-АТ, причем в последнем случае используются довольно сложные конструкции (например, ЕВР пат. N 129434, кл. A 61 K 39/44 и др.). По идее, заключенной в этих изобретениях, такие типы лабильного связывания должны одновременно обеспечивать стабильность макромолекулы в процессе транспорта и, если необходимо, эндоцитоза, и функциональную независимость в процессе цитотоксического действия лекарственного вещества.

Таким образом, исходные свойства конъюгируемых частей, характер и способы конъюгации в большинстве случаев непредсказуемо влияют на конечный результат, и собственно составляют предметы изобретений.

Проблема создания векторных молекул на основе АТ являются общими и для предлагаемого нового подхода к созданию векторных лекарственных средств.

Общим недостатком иммуноконъюгатов является то, что их повторное введение может спровоцировать иммунные реакции организма. Поэтому все большее внимание привлекает возможность создания для БАВ векторов на основе онкофетальных белков и факторов роста, являющихся физиологическими лигандами соответствующих рецепторов, плотность которых особенно высока на опухолевых клетках.

Среди онкофетальных белков, к которым относятся раковоэмбриональный антиген, плацентарная щелочная фосфатаза, альфа, бета, гамма и основной фетопротеины, панкреатический фетальный белок и др. наиболее перспективным в качестве вектора для цитотоксических препаратов представляется альфа-фетопротеин (АФП), т. к. он специфически связывается и эндоцитируется опухолевыми клетками, в то время как уровень его рецепторов на нормальных клетках человека очень низок.

АФП белок, структура которого хорошо изучены. Он состоит из одной полипептидной субединицы. Его молекулярная масса 74 кД. АФП содержит углеводный компонент, составляющий от 3 до 4,3% В состав углеводов, связанных с АФП, входит глюкоза, галактоза, манноза, N-ацетилглюкозамин и сиаловая кислота. АФП состоит из 590 аминокислотных остатков, содержит 32 цистeinовых остатка, но не содержит свободных SH-групп, содержит 1 N-связанный с аспарагином гликан в положении 232. Считают, что микрогете-

рогенность АФП связана с составом гликана. В первичной структуре выделяют 3 домена, причем первый гомологичен аналогичному домену мышей и крыс. Специфические функции АФП, касающиеся связывания эстрогенов, определяются 1-ым доменом. Гомология АФП с альбумином составляет 35–40% но с 38 по 119 остаток у АФП гомологии с другими белками нет.

Накопление АФП в клетках происходит в результате рецептор-опосредованного эндоцитоза этого белка. С помощью электронной микроскопии было показано, что ковалентносвязанные коньюгаты АФП с пероксидазой хрена (последняя использована для визуализации АФП) в процессе эндоцитоза сначала обнаруживаются в клятинных везикулах, затем в эндосомах и в складчатых мембранных центральной области аппарата Гольджи, в то время как яичный альбумин после интернализации (степень его интернализации очень низка) обнаруживался в лизосомах. После интернализации основная часть АФП не подвергается деградации, вновь выделяется в экстра-клеточную среду, т. е. АФП подвергается рециклированию. Показано исключительно высокое содержание рецептора АФП в опухолях.

Наиболее близким к предлагаемому (прототипу) является техническое решение, представляющее собой коньюгаты БАВ с АФП, обладающие избирательным действием по отношению к раковым клеткам-мишеням (заявка РСТ N 94/19021, нац. патенты в указанных странах получены), в котором коньюгированные части соединены лабильной пептидной связью.

В заявке подробно описан способ выделения, очистки и дана характеристика АФП человека, а также описаны способы получения коньюгатов как по белковой, так и углеводной части АФП, причем в обоих случаях создаются лабильные пептидные связи.

Способ получения коньюгатов БАВ с АФП путем модификации белковой части АФП (принят за прототип для предлагаемых способов) состоит во взаимодействии амино- или карбоксильных групп БАВ соответственно со свободными карбоксильными или амино-группами белка с помощью карбодимида, либо его производных.

В известном техническом решении притязания распространяются и на фармацевтические композиции на основе указанных выше коньюгатов в эффективном количестве и приемлемых с точки зрения фармацевтики носителей (прототип для композиций).

В приведенных к заявке примерах на соответствующих моделях была показана возможность эффективного лечения лейкозов, лимфом, гепатом, нейробластом, меланом и астроцитом, причем на культурах клеток цитотоксический эффект коньюгатов был всегда выше (определялся по числу погибших клеток) действия исходных цитотоксических веществ.

Механизм цитотоксического действия конью-

гатов не полностью изучен, однако предполагалось, что благодаря тому, что наиболее широкий набор гидролитических ферментов локализован в лизосомах, коньюгат может быть стабилен вплоть до процесса эндоцитоза, который приводит к эффективному проникновению коньюгированного лекарства внутрь клеток-мишней. Затем действующее начало высвобождается и проявляет свою исходную функциональную активность, за счет чего и происходит нарастание общей активности коньюгата по сравнению с неконьюгированным лекарством.

Однако в дальнейшем было обнаружено, что эффективность воздействия существенным образом зависит от способа введения коньюгатов животным-опухоленосителями: они были высокоэффективны при подкожном введении и оказывали лишь незначительный эффект при внутреннем способе введения.

Такое уменьшение активности связано прежде всего с возможностью расщепления пептидной связи ферментами, содержащимися в биологических жидкостях организма.

Указанный недостаток является существенным ограничением в применении известных коньюгатов, так как в клинической практике необходим прежде всего внутривенный способ введения препаратов.

Дальнейшие исследования были направлены на устранение указанного недостатка.

Изобретение стало возможным в результате обнаружения нетривиального с научной точки зрения факта сохранения в полном объеме функциональных свойств исходных частей в коньюгате при их соединении химической связью, высокоустойчивой к действию протеаз и др. ферментов биологических жидкостей (сыворотки крови, лимфы, внутриклеточного содержимого), так как цитотоксический эффект в полной мере проявляется и без высвобождения действующего начала из коньюгата.

Это позволяет рассчитывать на возможность для предлагаемых коньюгатов применения внутривенного способа введения, пролонгированного характера фармакологического действия коньюгатов и просто расширяет ассортимент средств известного назначения.

Таким образом, предметом настоящего изобретения являются коньюгаты БАВ с АФП, обладающие избирательным действием по отношению к раковым клеткам-мишеням, в которых коньюгированные части соединены высокоустойчивой к действию протеаз и др. ферментов биологических жидкостей химической связью.

К таким связям относят тиоэфирные (простой эфир), альдиминные связи, амидные (типа амидной связи в капроне) и др.

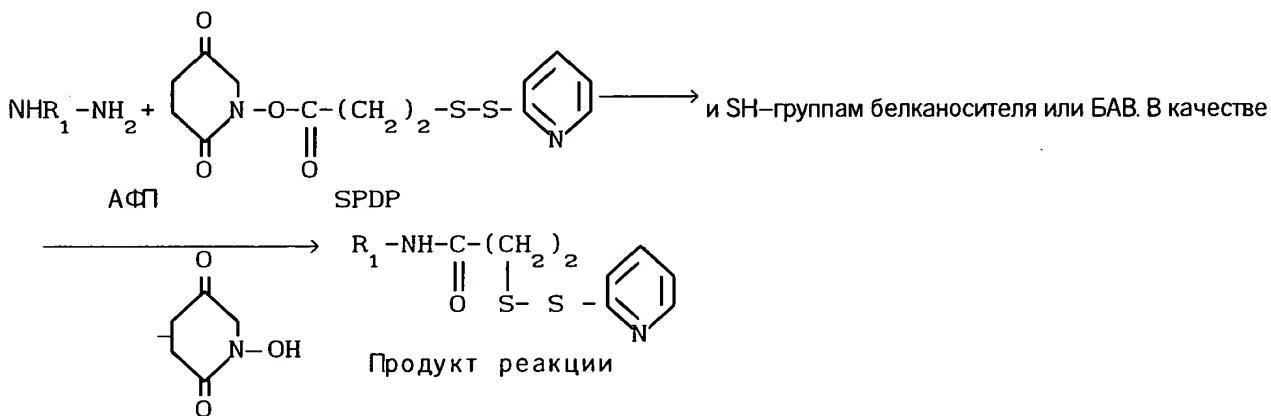
В настоящий момент в качестве наиболее оптимальных способов получения заявленных коньюгатов предлагаются два способа.

Предлагается способ получения коньюгатов БАВ с АФП путем модификации белковой части молекулы АФП, отличительной особенностью которого

является то, что белок или БАВ, содержащие аминогруппу, вводят во взаимодействие с сукцинимидил транс-4-(N-малеимидилметил)циклогексан-1-карбоксилатом (SMCC) или N-гидроксисукцинимидным эфиром 3-малеимидобензойной кислоты (MBS), после чего осуществляют сшивку полученного производного с БАВ или белковой частью АФП, соответственно, по SH-группам, которые присутствуют исходно или вводятся дополнительно с помощью сукцинимидного эфира 3-(2-пиридилдитио)пропионовой кислоты (SPDP).

Также предлагается способ получения коньюгатов БАВ с АФП путем модификации белковой части молекулы АФП, отличительной особенностью которого является то, что осуществляют конденсацию аминогрупп белка с альдегидной группой, исходно содержащейся в БАВ или дополнительно в него введенной после активации периодатом, и последующего восстановления полупродукта боргидридом.

Предметом настоящего изобретения являются также фармацевтические композиции на основе коньюгатов БАВ с АФП в эффективном количестве и



дополнительных молекул, вводимых для последующего образования тиоэфирной связи, использованы SMCC и SPDP.

Пример 1. Если БАВ содержит свободную NH<sub>2</sub>-группу, то синтез коньюгата происходит следующим образом.

На 1-ом этапе в молекулу белка-носителя АФП с помощью SPDP вводят SH-группы, образующиеся после восстановления -S-S- связи в SPDP с помощью дитиотреитола или меркаптоэтанола. SPDP присоединяется к белку по свободным NH<sub>2</sub>-группам. Пептидоподобная связь, образующаяся между белком и SPDP, подобна той, что образуется при синтезе капрона, и также устойчива к действию протеаз.

На 2-ом этапе происходит введение SMCC в молекулу БАВ. При этом в качестве БАВ могут быть использованы соединения самых разных классов: белки, антибиотики, антиметаболиты, алкалоиды, если она содержит свободную NH<sub>2</sub>-группу. Связь,

приемлемых носителей, отличительной особенностью которых является то, что в качестве коньюгатов они содержат коньюгаты, описанные выше, и носители, пригодные для внутривенного введения.

При этом носителем может быть физиологический раствор, фосфатно-солевой раствор, обезболивающие препараты, например новокаин, противомикробные, противовирусные и противо-паразитарные средства; средства, регулирующие метаболические процессы, другие препараты, применяемые для лечения онкологических больных (за исключением алкилирующих препаратов).

Ниже приведены примеры, доказывающие возможность использования предлагаемых коньюгатов по указанному назначению.

Пример 1-2. Коньюгаты АФП-БАВ, получаемые с образованием простой тиоэфирной связи.

Способ получения основан на введении в молекулу БАВ и белка-носителя дополнительных молекул, последующее взаимодействие между которыми приводит к образованию негидролизуемой тиоэфирной связи между БАВ и АФП. Введение дополнительных молекул происходит по свободным

образующаяся между SMCC и БАВ, устойчива к действию протеаз благодаря присутствию циклогексила.

На 3-м этапе происходит собственно синтез коньюгата АФП с БАВ, в котором БАВ присоединен к АФП с помощью тиоэфирной связи.

По этому методу могут быть получены коньюгаты с дифтерийным токсином, рицином, рибонуклеазой, аспарагиназой, метотрексатом, дауномицином, рубомицином, доксорубицином, карминомицином и другими NH<sub>2</sub>-содержащими БАВ.

Получение коньюгатов с использованием не-гидролизуемой сшивки (SMCC).

Ниже приведена конкретная методика получения коньюгата АФП с доксорубицином (ДР).

#### 1. Модификация АФП с помощью SPDP.

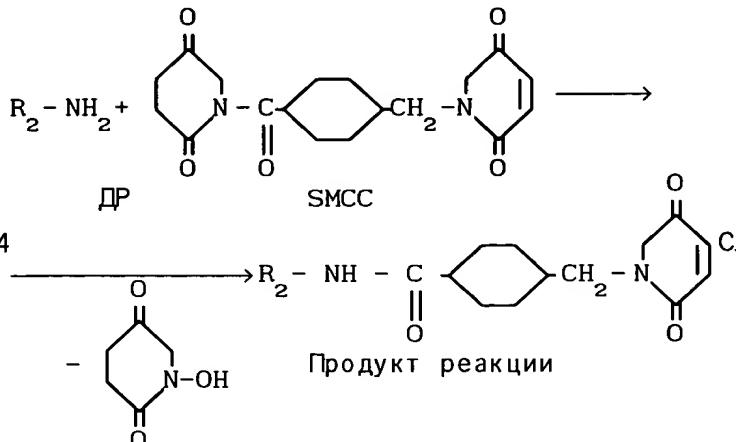
2

Методика. АФП растворяли в деионизованной воде и измеряли концентрацию белка по методу Lowry. 1 мл раствора АФП в деионизированной воде (концентрация АФП 1 мг/мл) диализовали против

RU 2071351 C1

0,01 М фосфатного солевого буфера (рН 7,4) и добавляли (при постоянном перемешивании) 4 мкл раствора 2,5 мг SPDP в 1 мл метанола (Fluka). Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение

2 ч, после чего добавляли сухой DTT до конечной концентрации 20 мМ (3,1 мг DTT), а затем трехкратно диализовали против 0,01 М фосфатного со-



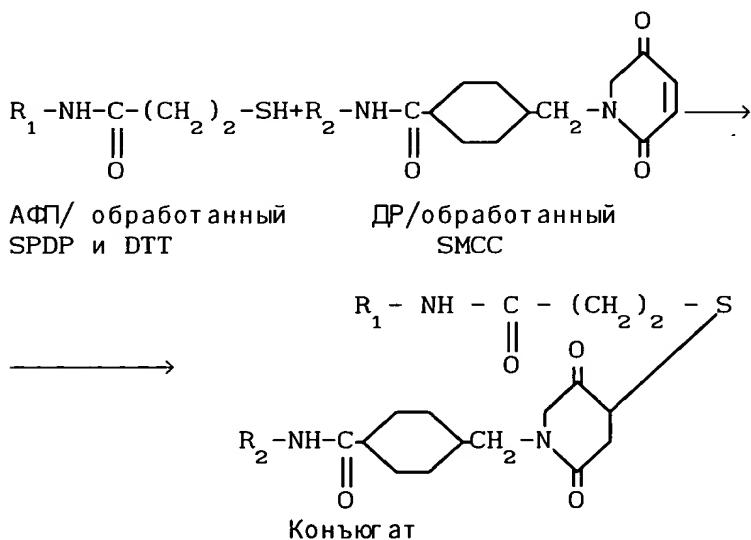
левого буфера (рН 7,4) в течение суток при +4°

2. Определение степени модификации АФП. Титрование аликвоты с 5,5-дитио-бис-2-нитробензойной кислотой показало, что одна молекула модифицированного АФП содержала в среднем две свободные сульфогидрильные группы.

### 3. Модификация молекулы DR.

Методика. К 26 мкл раствора 1 мг DR в 1 мл 0,01 М фосфатного буфера добавляли 4 мкл раствора 2,6 мг SMCC в 1 мл ДМСО (Sigma). Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 1,5 ч.

### 4. Синтез коньюгатов АФП-DR.



Методика. К DR, обработанному с помощью SMCC, добавляли 1 мг модифицированного АФП, инкубировали в течение 12–18 ч при

+4° Концентрация DR:  $C_{DR} = \frac{A_{480}}{E_{480, DR}}$  Си  
трехкратно диализовали против 0,01 М фосфатного солевого буфера (рН 7,4) в течение суток при +4° С.

Полученный коньюгат идентифицировали с помощью методов гельфильтрации и электрофореза.

5. Определение соотношения АФП: DR в полученным коньюгате:

а) измеряли оптическую плотность полученных коньюгатов на спектрофотометре (Hitachi) при длинах волн 280 и 480 нм и рассчитывали кон-

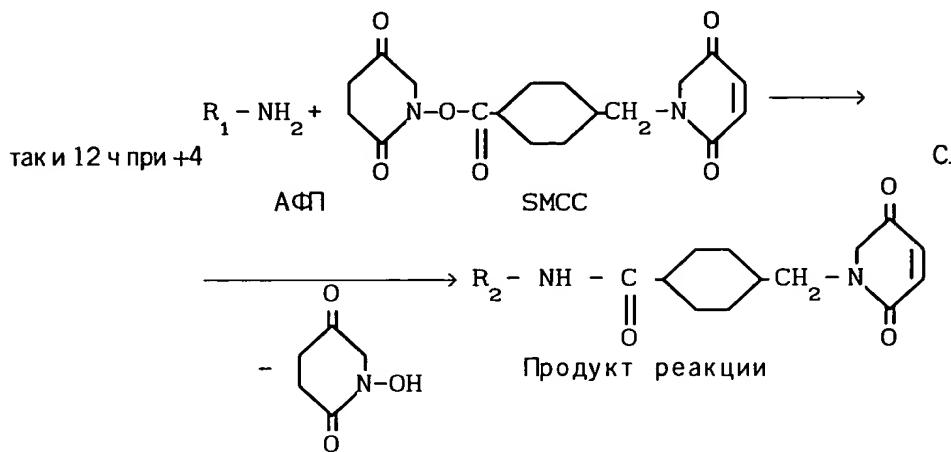
центрацию DR ( $C^o$ ) по формуле:

DR

б) в 96-луночную плату вносили по 200 мкл исследуемого коньюгата DR с концентрацией по доксорубицину от 10 до 50 мкМ и измеряли поглощение раствора на многоканальном спектрофотометре "Multiscan" при длине волны 450 нм. Для каждого определения строили калибровочную кривую, измеряя поглощение смесей АФП с известными количествами DR. Измерение можно было проводить до истечения 1 ч хранения при комнатной температуре.

Молярное отношение АФП: DR в коньюгате оказалось равным 1:2.

С целью оптимизации общей методики готовили также конъюгаты, добавляя к 1 мг АФП в 1 мл 0,01 М фосфатного солевого буфера (рН 7,4) 8, 12 и 16



Для конъюгирования брали 26; 52,5 и 105 мкл раствора 1 мг ДР в 1 мл 0,01 М фосфатного солевого буфера, pH 7,4.

В результате были получены коньюгаты с молярным отношением АФП:ДР от 1:2 до 1:6.

Токсичность полученных коньюгатов тестировали на линии клеток человеческой лимфобластомы QOS. Наиболее активным оказался коньюгат с молярным отношением АФП: ДР 1: 3, при модификации АФП с

помощью SPDР в течение 12 ч при +4° С.

Данные по свойствам коньюгатов приведены в табл. 1.

Пример 2. Коньюгаты АФП с БАВ, содержащими SH- группу или –S–CH (например, с калихемицином), могут быть получены следующим образом.

На 1-ом этапе происходит восстановление S-S-связи калихемицина с помощью дитиотреотопа или меркаптоэтанола. Если молекула БАВ уже содержит свободную SH-группу, такое восстановление не

мкл раствора 2,5 мг SPDP в 1 мл метанола. Смесь инкубировали как при комнатной температуре (2 ч).

требуется.

На 2-ом этапе происходит введение SMCC в молекулу АФП.

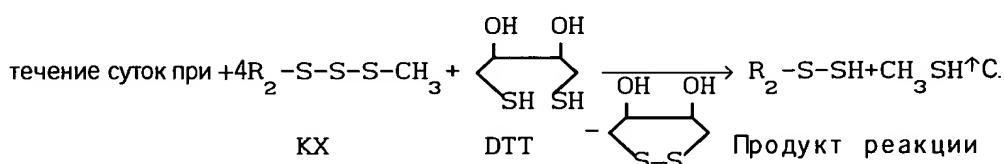
На 3-м этапе происходит синтез коньюгата АФП с БАВ с образованием тиоэфирной связи.

Пример получения коньюгата АФП с калихимицином (КХ).

#### **1. Модификация АФП с помощью SMCC.**

1

**Методика.** АФП растворяли в деионизованной воде и измеряли концентрацию белка по методу Lowry. 1 мл раствора АФП в деионизированной воде (концентрация АФП 1 мг/мл) диализовали против 0,01 М фосфатного солевого буфера (рН 7,4) и добавляли (при постоянном перемешивании) 4 мкл раствора 2,6 мг SMCC в 1 мл ДМСО (Sigma). Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 1,5 ч, после чего трехкратно диализовали против 0,01 М фосфатного солевого буфера (рН 7,4) в

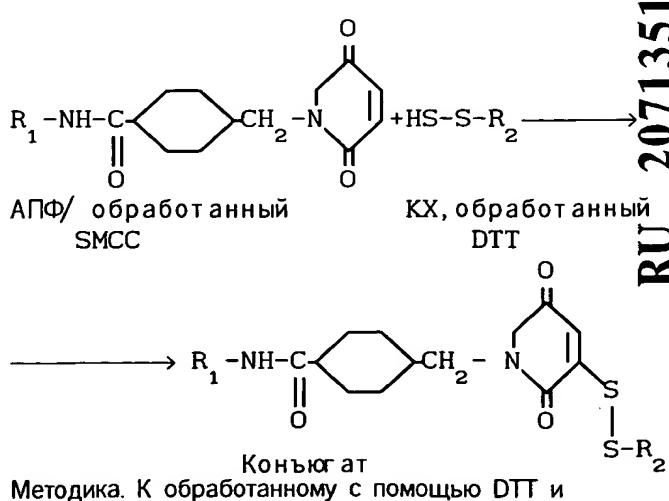


## 2. Модификация молекулы КХ

8

Методика. К 57 мкл раствора 1 мг КХ в 1 мл этилового спирта добавляли 1 мл раствора 3 мг дитиотрептоля (DTT) в 1 мл 0,01 М фосфатного солевого буфера (pH 7,4), инкубировали смесь при комнатной температуре в течение 1 ч, замораживали в жидким азоте и лиофилизировали.

### 3. Синтез конъюгатов АФП-КХ



лиофилизированному КХ добавляли 1 мг моди-

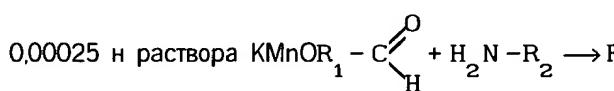
$$\text{Ч при } +4 \text{ Концентрация КХ: } C_{\text{КХ}} = \frac{A_{333}}{E_{333, \text{КХ}}}$$

$$\text{Концентрация АФП: } C_{\text{АФП}} = \frac{A_{280} - (3 \times A_{333})}{E_{333, \text{АФП}}}$$

фосфатного солевого буфера (рН 7,4) в течение суток при +4 С.

Полученный коньюгат идентифицировали с помощью методов гельфильтрации и электрофореза.

4. Определение соотношения АФП: КХ в полученным коньюгате:



ремешивании по 50 мкл исследуемого раствора КХ (коньюгата КХ) с концентрацией по калихемицину от 100 до 400 нМ. Делали также контрольную расшивку КХ. После перемешивания инкубировали в течение 1 ч при 40 С (до заметного обесцвечивания 400 нМ раствора КХ) и измеряли поглощение раствора на многоканальном спектрофотометре "Multiscan" при длине волн 540 нм. Измерение можно было проводить до истечения 1 ч хранения при комнатной температуре.

Примечание: раствор KMnO<sup>0</sup> хранится при комнатной температуре не более 1 недели.

Молярное отношение АФП: КХ в коньюгате оказалось равным 1: 2.

С целью оптимизации общей методики готовили также коньюгаты, добавляя к 1 мг АФП в 1 мл 0,01 М фосфатного солевого буфера (рН 7,4) 8, 12 и 16 мкл раствора 2,6 мг SMCC в 1 мл ДМСО (Sigma). Смесь инкубировали как при комнатной температуре (2 ч), так и 12 ч при +4 С.

Для коньюгирования брали 57; 114 и 228 мкл раствора 1 мг КХ в 1 мл этилового спирта.

В результате были получены коньюгаты с молярным отношением АФП: КХ от 1: 2 до 1: 8.

Токсичность полученных коньюгатов тестировали на линии клеток человеческой лимфобластомы QOS. Наиболее активным оказался коньюгат с молярным отношением АФП: КХ 1: 4, при модификации АФП с

помощью SMCC в течение 12 ч при +4 С.

Данные по свойствам коньюгатов приведены в табл. 2.

Пример 3. Коньюгаты АФП-БАВ, получаемые с образованием азометиновой связи.

Негидролизуемая азометиновая связь АФП с БАВ может быть получена при непосредственном взаимодействии альдегидной группы БАВ с NH - группой АФП. По этому методу могут быть получены коньюгаты АФП с винкристином (ВК). Поскольку молекула винкристина уже содержит альдегидную группу, коньюгат АФП с ВК может быть получен при

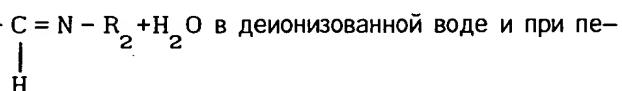
фицированного АФП, инкубировали в течение 12013

С и трехкратно диализовали против 0,01 М

а) измеряли оптическую плотность полученных коньюгатов на спектрофотометре (Hitachi) при длинах волн 280 и 333 нм и рассчитывали концентрации по формулам:

о

б) В 96-луночную плату вносили по 200 мкл



непосредственном взаимодействии растворов указанных веществ в 0,1 М карбонатном буфере (рН 9,0) по схеме:

о

R<sub>1</sub> БАВ

R<sub>2</sub> белок-носитель (АФП).

Методика. АФП растворяли в дистиллированной воде и измеряли концентрацию белка по методу Lowry 1 мл раствора АФП в дистиллированной воде (концентрация АФП 1 мг/мл) диализовали против 0,1 М карбонатного буфера (рН 9,0) и добавляли (при постоянном перемешивании) 41 мкл раствора, содержащего 1 мг винкристина в 1 мл того же буфера. Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч, после чего трехкратно диализовали против 0,01 М (рН 7,4) в течение суток

при +4° С. Полученный коньюгат идентифицировали с помощью методов гельфильтрации и электрофореза.

Пример 4. Эффективность коньюгатов АФП, содержащих негидролизуемую связь с доксорубицином, в отношении опухолевых клеток различных линий, оцениваемая по их выживаемости.

Действие полученных по примеру 1 коньюгатов было исследовано на следующих линиях клеток Т-клеточная лимфома человека линии QOS, карцинома яичника человека линии SROV3 и резистентная линия карциномы яичника человека, экспрессирующая ген множественной устойчивости, SKVLB.

Протокол испытаний был общим для всех проведенных испытаний и состоял в следующем. Клетки Т-клеточной лимфомы человека линии QOS, карциномы яичника человека SKOV3 и SKVLB культивировали в пластиковых флаконах (Costar) в среде RPMI 1640 с добавлением 10%-ной фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Gibco), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco) при 37° С в увлажненной атмосфере, со-

держащей 5% CO<sub>2</sub>.

Для количественной оценки выживаемости клеток при действии различных препаратов их инкубировали в 96-луночных планшетах с различными концентрациями исследуемых веществ (по три параллельных измерения для каждой концентрации) в течение 3 суток, затем на 2–4 ч добавляли 50 мкл раствора (1 мг/мл) МТТ 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромида) в среде к 200 мкл среды с клетками. После развития окраски среду удаляли, кристаллы формазана растворяли в 150 мкл диметилсульфоксида и измеряли интенсивность окраски при 540 нм на многоканальном спектрофотометре. Выживаемость клеток оценивали в процентах от соответствующего контроля.

На фиг. 1 представлены данные о выживаемости клеток карциномы яичника человека линии SKOV3 при инкубации с доксорубицином (ДР) или с конъюгатами АФП–ДР с гидролизуемой (Г) или негидролизуемой (НГ) связью. Из этих данных следует, что оба конъюгата значительно более токсичны, чем свободный ДР в отношении клеток SKOV3, а токсичность конъюгатов АФП–ДР с Г и НГ связью близка.

На фиг. 2 представлены данные о выживаемости клеток карциномы яичника человека линии SKVLB, устойчивых к действию ДРК, при инкубации с конъюгатами АФП: ДР с Г и НГ связью соответственно. Эти данные демонстрируют высокую цитотоксическую активность конъюгатов АФП: ДР с НГ связью и в отношении линии клеток, обладающих множественной лекарственной устойчивостью, обусловленной экспрессией гена mdr1.

При использовании схемы эксперимента с отмыванием препарата через 1 ч инкубации и без отмывания конъюгатов с НГ (А) и Г (В) связью, оказалось, что при использовании НГ связи IC50 при инкубации без отмывания возрастает в 20 раз по сравнению с IC50 для варианта с отмыванием препарата спустя 1 ч от начала инкубации (фиг. 3A). В то же время при той же схеме эксперимента при Г связи АФП–ДР IC50 при инкубации без отмывания возрастает лишь в 7–8 раз (фиг. 3B), что свидетельствует о меньшей степени деградации конъюгата с НГ связью, т. е. при использовании конъюгата, полученного в соответствии с данным изобретением.

Из представленных результатов следует, что

### Формула изобретения

1. Конъюгаты биологически активных веществ с альфа-фетопротеином, обладающие избирательным действием по отношению к раковым опухолям, в которых конъюгированные части соединены химической связью, устойчивой к действию протеаз и других ферментов биологических жидкостей.

2. Конъюгаты по п. 1, в которых в качестве биологически активного вещества содержится калихемицин.

конъюгаты, полученные по примеру 1, обладают таким же уровнем цитотоксической активности, как конъюгаты, полученные по прототипу и, они сохраняют свои свойства и в композициях, т. к. эксперименты на культурах клеток проводили с использованием культуральной среды, как без антибиотиков, так и с добавлением пенициллина и стрептомицина.

Пример 5. Противоопухолевая эффективность полученного по примеру 1 конъюгата АФП с доксорубицином в композиции с физиологическим раствором на модели перевиваемых опухолей мышей.

Для исследования противоопухолевого действия конъюгатов АФП с ДР, полученных как описано в примере 1 (НГ–связь) и в прототипе (Г–связь), вводили в суточной дозе 140 или 280 мкг/кг препарата.

Для оценки терапевтической активности препаратов в отношении солидных опухолей, полученных при п/к введении мышам опухолевых клеток линии Р388 использовали в/в способ введения препаратов. Полученные результаты представлены в табл. 3 и на фиг. 4. Препараты введены в/в в дозе 140 или 280 мкг/кг по ДР по схеме 3 раза по 1 инъекции раз в три дня.

Из данных, представленных в табл. 3, следует, что заявляемый конъюгат позволяет получить терапевтический эффект при в/в способе введения препарата, который оценивался по УСПЖ животных, частоте образования опухолей и частоте случаев излечения.

Из фиг. 4 следует, что полученный по примеру 1 конъюгат АФП: ДР с НГ связью замедлял время появления опухолей и скорость их роста. Торможение роста опухоли при дозе 140 мкг/кг и 280 мкг/кг составило 68,2 и 88,5% соответственно.

Таким образом, показано, что при использовании НГ сшивки ДР с АФП удается получить эффективный при в/в введении конъюгат. Для оптимизации действия таких конъюгатов с ДР и КХ будет отработана специальная схема и выбраны дозы в/в введения препаратов.

Фармацевтические композиции для инъекций получают растворением конъюгата в физрастворе или фосфато-солевом растворе. РН растворов около 7,4. Концентрация конъюгата в растворе составляет 15–35 мг/мл.

3. Способ получения конъюгатов биологически активных веществ с альфа-фетопротеином,ключающий химическое связывание конъюгируемых частей с использованием модифицирующих агентов, отличающийся тем, что указанный белок или биологически активное вещество, содержащие аминогруппу, вводят во взаимодействие с сукциниimidил-транс-4-(N-малеимидил-метил)циклогексан-1-карбоксилатом, после чего

осуществляют сшивку полученного производного с биологически активным веществом или белковой частью альфа-фетопротеина соответственно по SH-группам, которые присутствуют исходно или вводятся дополнительно с помощью сукцинимидного эфира 3-(2-пиридинилдиго)пропионовой кислоты.

4. Способ получения конъюгатов биологически активных веществ с альфа-фетопротеином с помощью модификации белковой части молекулы альфа-фетопротеина, отличающийся тем, что осуществляют конденсацию аминогрупп белка с альдегидной группой, содержащейся в биологи-

чески активном веществе исходно или дополнительно в него введенной после активации периодатом, и последующего восстановления полу продукта боргидридом.

5. Фармацевтическая композиция, содержащая коньюгат биологически активного вещества с альфа-фетопротеином и фармацевтически приемлемый носитель, отличающаяся тем, что она содержит эффективное количество коньюганта, в котором конъюгированные части соединены устойчивой к протеолизу химической связью, и носитель, пригодный для внутривенного введения.

### Таблицы

Таблица 1

N пп	Методика приготовления конъюгатов	Соотношение АФП:ДР в полученном конъюгате	Выживаемость клеток QOS, %
1.	К полученному при 20°С в течение 2 ч и отдиали- зованному АФП-SPDP (1:2) добавляли 3 мол ДР (опи- сание см. выше)	1:2	27
2.	См.1, +4°С, ночь, АФП-SPDP:ДР = 1:6	1:2	20
3.	См.2, АФП-SPDP = 1:4	1:3	4
4.	См.3, +20°С, 2 ч, АФП-SPDP:ДР = 1:12	1:4	27
5.	См.4, АФП:SPDP = 1:8	1:6	56

RU  
2071351 C1

Таблица 2

N пп	Методика приготовления конъюгатов	Соотношени АФП:КХ в полученном конъюгате	Выжива мость клеток QOS, %
1.	К полученному при 20° С в течение 2 ч и отдиали- зованному АФП-SMCC (1:2) добавляли 3 мол КХ (опи- сание см. выше)	1:2	63
2.	См. 1, +4° С, ночь, АФП-SMCC:KX=	1:6	78
3.	См. 2, АФП-SMCC=1:4	1:4	5
4.	См. 3, +20° С, 2ч, АФП-SMCC:KX=	1:12	31
5.	См. 4, АФП:SMCC=1:8	1:6	7

RU    2071351    C1

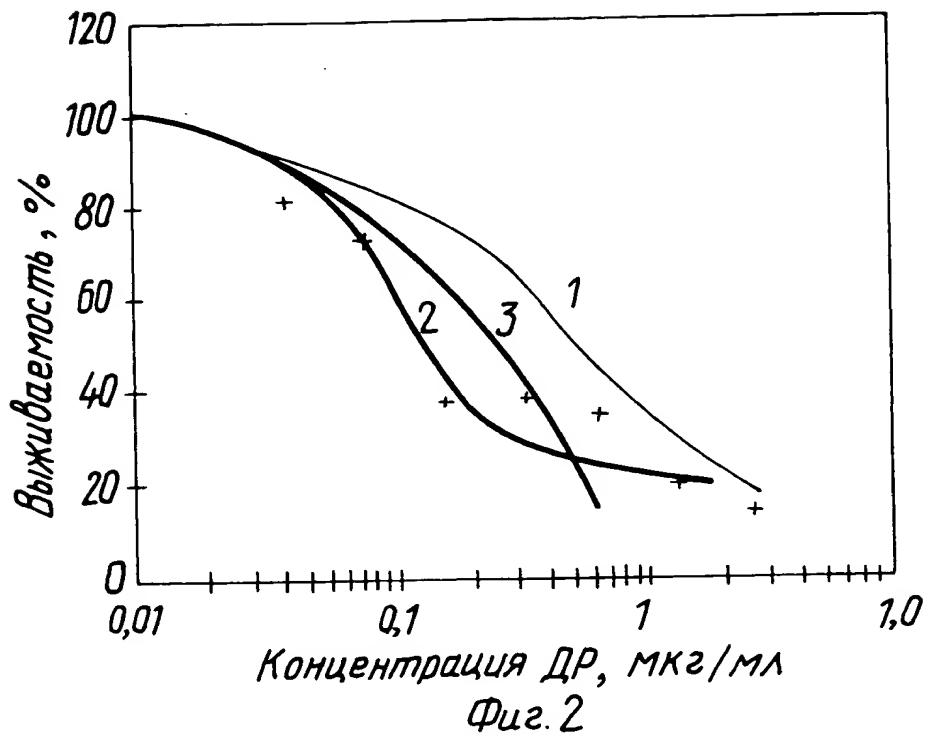
## Таблица 3

Противоопухолевая активность конъюгатов АФП с ДР с НГ и Г сшивкой при лечении солидной формы перевиваемой опухоли линии Р388.

Препарат, мкг/кг	УСПЖ, %	Частота образования опухолей, %	Частота случаев излечения, %
Контроль	-	100	0
<hr/>			
АФП:ДР, Г			
140	-7,1	100	0
280	0	100	0
<hr/>			
АФП:ДР, НГ			
140	26,0	80	20
280	75,0	60	40
<hr/>			

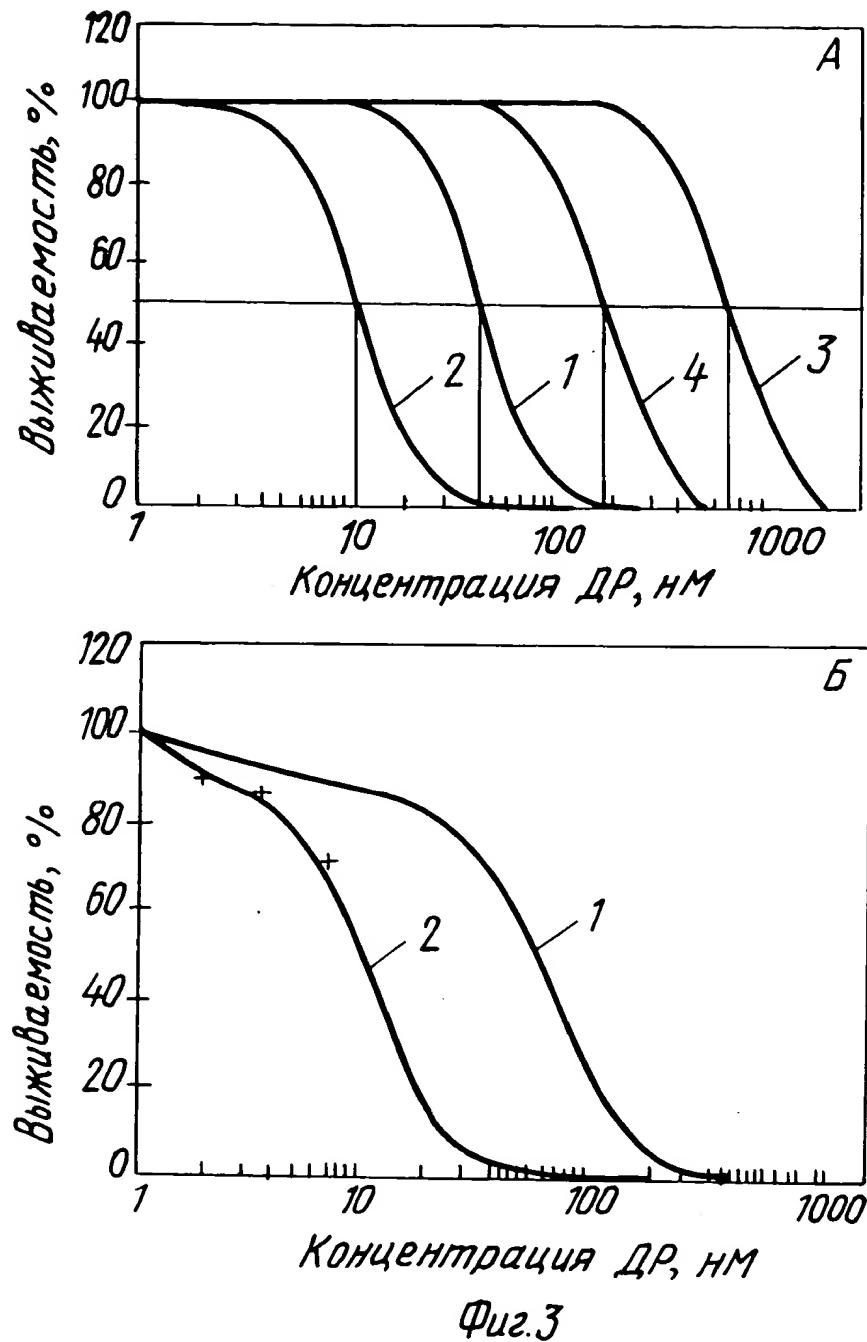
RU 2071351 C1

**Чертежи**



Фиг. 2

RU 2071351 C1

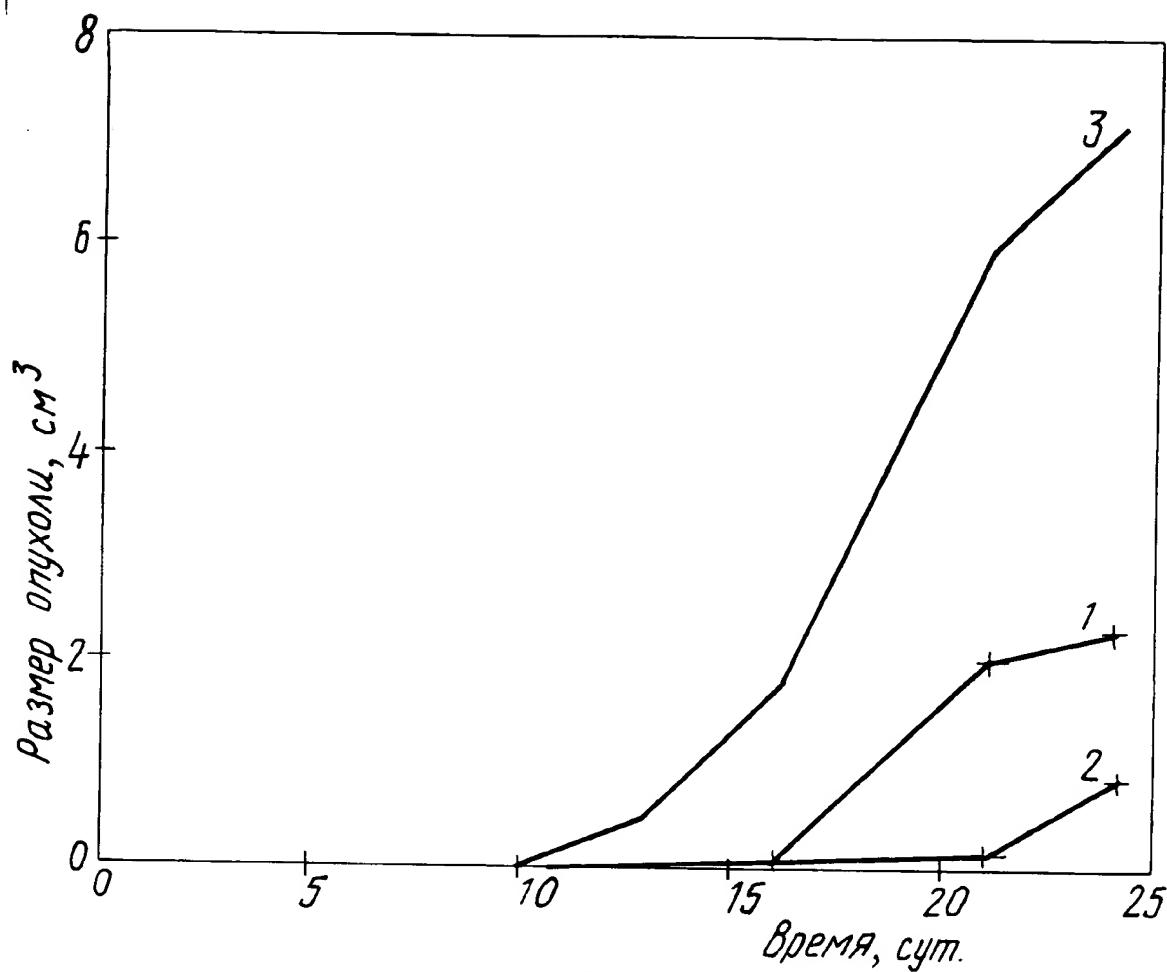


Фиг.3

29

2071351

30



Фиг.4

RU 2071351 C1